

Untersuchungen über den Abbau auf biologischem Wege ^{14}C -signierter ungesättigter Fettsäuren

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von

Martin Rothlin

von Lachen/SZ und Basel

1958

Meinem Vater zum 70. Geburtstag gewidmet

Untersuchungen über den Abbau auf biologischem Wege ^{14}C -signierter ungesättigter Fettsäuren

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von

Martin Rothlin

von Lachen/SZ und Basel



1958

Von der Medizinischen Fakultät genehmigt
auf Antrag von Prof. Dr. K. Bernhard

Tag der Promotion: 4. 7. 58

Herrn Prof. Dr. Karl Bernhard, auf dessen Veranlassung die vorliegende Arbeit entstand, möchte ich an dieser Stelle für seine wertvolle Unterstützung und seine zahlreichen Ratschläge bestens danken.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546715_0052

Einleitung

Die Aufnahme gewisser mehrfach ungesättigter Fettsäuren ist für die zahlreichen bis jetzt untersuchten Säugetiere, ja selbst für gewisse Insekten, Voraussetzung zu normalem Gedeihen. Fehlen diese lebensnotwendigen sogenannten *essentiellen Fettsäuren* in der Nahrung, können verschiedenste Mangelercheinungen beobachtet werden, deren Vielgestaltigkeit durch die folgende kurze Aufzählung illustriert werden soll:

Allgemeinerscheinungen: Wachstumsstillstand, Grundumsatzsteigerung, erhöhte Wasseraufnahme bei gleichbleibender Urinmenge. Erscheinungen an einzelnen Organen: Schuppige entzündliche Hautveränderungen, «Schachtelhalmschwanz», Haar- ausfall, Laktationsstörung, degenerative Veränderungen der Nieren, Permeabilitätsstörungen der Gefäße, Hemmung der Spermatogenese bzw. Ovulation, bis Sterilität usw.

Ausführliche Darstellungen zur Biochemie und Physiologie der essentiellen Fettsäuren stammen von *Bernhard* (1), *Bullet* (2), *Deuel* (3), *Holman* (4) u. a. Auch klinische Untersuchungen z. B. über die Beeinflussung gewisser Hautkrankheiten des Menschen durch essentielle Fettsäuren liegen vor. In letzter Zeit gilt das medizinische Hauptinteresse den Beziehungen zwischen ungesättigten Fettsäuren, Arteriosklerose und Cholesterinstoffwechsel.

Die essentiellen Fettsäuren, welche die beschriebenen Mangelerscheinungen verhindern bzw. heilen, lassen sich in zwei Gruppen einteilen:

1. solche pflanzlicher Herkunft, wie Linolsäure, Linolensäure, γ -Linolensäure,
2. solche tierischer Herkunft, wie Arachidonsäure und andere Polyensäuren mit 20 resp. 22 C-Atomen.

Nicht nur die Arachidonsäure (5), sondern auch andere Polyenfettsäuren mit 20 und 22 C-Atomen, werden im Tierkörper aus Linol- und Linolensäure durch Kettenverlängerung aufgebaut (6). In Pflanzen hat man Arachidonsäure noch nie nachgewiesen.

Linol- und Linolensäure werden, wie *Bernhard* (7) und *Schönheimer* (8) in Versuchen mit Deuterium als Indikator schon 1940 zeigen konnten, weder von der Maus noch von der Ratte synthetisiert. Andere Autoren haben diese Befunde unter Heranziehung der radioaktiven Kohlenstoffisotopen bestätigt (9). Ganz kürzlich wurde von *James* (10) mitgeteilt, daß in der Linolsäure aus menschlichen Erythrozyten, welche mit ^{14}C -Acetat bebrütet wurden, Aktivität nachweisbar war. Diese Befunde bedürfen indessen noch der Bestätigung.

Schon *Burr* und *Burr* (11) beschrieben im Jahre 1928 die Linolsäure und die Linolensäure als lebensnotwendige Fettsäuren. Eine weitere Octadecatriensäure, die γ -Linolensäure soll sich nach Versuchen von *Thomasson* (12) mit einem quantitativen Testverfahren, das auf dem Wasser-Konsum der Tiere beruht, in ihrer biologischen Wirkung von der Linolsäure nicht unterscheiden, während gewöhnliche Linolensäure einen viel schwächeren Effekt aufweist.

Die vorliegende Arbeit ist ein Beitrag zum *Stoffwechsel* der γ -Linolensäure und der Linolsäure im Tierkörper (Ratte). Unsere Untersuchungen basieren auf der Verwendung ^{14}C -signierter Fettsäuren*, die auf biologischem Wege durch Züchtung eines Schimmelpilzes (*Phycomyces Blakesleeana*) in ^{14}C -Acetat-haltiger Nährlösung erhalten wurden. Die Signierung erfaßt dabei einen wesentlichen Anteil der C-Atome der Fettsäurenkette und nicht nur die Carboxylgruppe (13).

* Herrn Dr. *L. Abisch* und Herrn cand. phil. *R. Wyß* möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung der signierten Fettsäuren bestens danken.

Problemstellung

Der Abbau ungesättigter Fettsäuren im Tierkörper ist noch nicht geklärt, vor allem über das Verhalten der Doppelbindungen ist wenig bekannt.

Im ersten Teil dieser Arbeit versuchten wir zu bestimmen, in welchem quantitativen Ausmaß an Tiere verabreichte ungesättigte Fettsäuren zu Kohlensäure oxydiert werden. Die exakte Messung der Aktivität der Expirationskohlendioxid nach Applikation ^{14}C -markierter, abbaufähiger Verbindungen erlaubt eine einwandfreie Beantwortung dieser Frage. Wir haben hochaktive Linol-, γ -Linolen- und Ölsäure rigoros fettfrei ernährten Ratten, sowie normal gefütterten Tieren verabreicht.

Der zweite Teil unserer Untersuchungen ist dem Schicksal der Doppelbindungen ungesättigter Fettsäuren im Tierkörper gewidmet. Wie *Bernhard* und *Gloor* (14) zeigten, wird Ölsäure durch biologische Oxydation an der Doppelbindung in Stellung 9—10 nicht gespalten, denn es konnten weder Pelargonsäure noch Azelainsäure nachgewiesen werden. Wir versuchten abzuklären, ob im Organismus der Ratte eine Hydrierung der Linolsäure und γ -Linolensäure zu Stearinsäure stattfindet. Ferner schien es uns wünschenswert, die von *Schönheimer* und *Rittenberg* (15) (16) seinerzeit mit Deuterium als Indikator gezeigte Umwandlung der Stearinsäure in Ölsäure unter günstigeren Voraussetzungen und unter Berücksichtigung der quantitativen Seite des Problems zu überprüfen und vor allem die Umkehr dieses Vorganges, also die Hydrierung der Ölsäure zu Stearinsäure im Tierkörper abzuklären.

Eigene Versuche

1. Bestimmung des zeitlichen Ablaufes der Oxydation von Linol-, γ -Linolen- und Ölsäure im Tierkörper.

Nachdem uns ^{14}C -signierte Fettsäuren mit über die C-Kette verteilter Aktivität zur Verfügung standen, konnte durch Messung der Aktivität der Expirationskohlendensäure das Ausmaß ihres völligen zu CO_2 und H_2O führenden Abbaues in gegebenen Zeitintervallen gemessen werden. Wir haben ^{14}C -signierte γ -Linolen-, Linol- oder Ölsäure hinreichender Aktivität in kleinen Dosen peroral an Ratten verabreicht. Diese wurden unmittelbar darauf in Stoffwechselkäfige gebracht, welche das quantitative Sammeln der Expirationskohlendensäure erlaubten. Da die Resorption der öligen Lösung individuell verschieden verlaufen konnte, mußten die Versuche auf einen längeren Zeitraum von mindestens 24 Stunden ausgedehnt werden. Die Expirationskohlendensäure wurde in den ersten 12 Stunden stündlich, dann bis zum Versuchsende zweistündlich auf ihre Radioaktivität geprüft. Wir haben den Abbau der genannten Fettsäuren einerseits an Tieren untersucht, die lange Zeit rigoros fettfrei gefüttert wurden und die wir in der Folge als EFA-Mangelratten bezeichnen. Andererseits benützten wir normal ernährte Tiere, welche, um einen Vergleich zu erleichtern, von ähnlichem Gewicht wie die EFA-Mangelratten waren.

Experimentelles

Wir benützten weiße Ratten aus dem Inzuchtstamm des Schweizerischen Vitamininstitutes in Basel. Die EFA-Mangeltiere hatten seit der Entwöhnung eine Diät nach Burr und Burr (11) folgender Zusammensetzung erhalten: 84% Rohrzucker, 12% fettfreies extrahiertes Casein, 4% Salzmischung nach McCollum. An Vitaminen wurde den Tieren zweimal wöchentlich verabreicht:

a) 5 Tropfen einer Mischung von 12,5 mg Vitamin D_3 , 100 mg Carotin, 50 mg Tocopherolacetat gelöst in 62 ml gehärtetem Cocosfett;

b) 0,5 ml einer Mischung von 2 ml «Becozym» (enthält 10 mg Aneurin, 4 mg Lactoflavin, 40 mg Nicotinsäureamid, 4 mg Pyridoxin, 6 mg Panthenol) und 0,8 g Cholinchlorid in 37 ml aqua dest.

Alle EFA-Mangeltiere zeigten die deutlichen Hautsymptome, wie sie für den Mangel an essentiellen Fettsäuren charakteristisch sind. Die Normalratten erhielten ein vollwertiges Futter.

Die signierten Fettsäuren wurden vor der Verabreichung mit Olivenöl verdünnt. Jede Ratte erhielt 0.5 ml eines solchen Gemisches. Wir bestimmten die spezifische Aktivität aller unserer Applikationslösungen und berechneten die pro Tier verabfolgte Gesamtaktivität. Diese Daten sind aus der Tabelle 1 ersichtlich. Während der Stoffwechselversuche standen allen Tieren Wasser und EFA-Mangelfutter ad libitum zur Verfügung. Die Exspirationskohlenensäure wurde in Natronlauge zur Absorption gebracht, dann als Bariumcarbonat gefällt und in gleichmäßiger Schicht auf Kupferplättchen in einer kontinuierlich arbeitenden Zählapparatur (Tracerlab) gemessen.

Tabelle 1.

Applizierte Aktivitäten c/Min. per Tier

Tier No.	Linolsäure	γ -Linolensäure	Oelsäure
3	9 210 000		
26	4 500 000		
17, 18, 19, 20 } 27, 28 }	9 170 000		
9, 10, 11, 12		18 100 000	
31, 32		40 410 000	
13, 14, 15, 16		8 740 000	
1, 2			11 800 000
4, 6, 7			10 590 000
8			6 780 000
21			9 910 000
25			10 650 000
29, 30			8 170 000

Ergebnisse

Aus Tabelle 2 sind die Resultate ersichtlich. Es zeigt sich, daß die EFA-Mangelratten durchschnittlich im Verlaufe von 24 Stunden

nach Gabe von γ -Linolensäure	65,0% $\pm$ 4,8
nach Gabe von Linolsäure	38,0% $\pm$ 2,5
nach Gabe von Ölsäure	46,7% $\pm$ 4,3

der applizierten Aktivität mit der Expirationskohlendensäure ausscheiden.

Tabelle 2.

Aktivitäten der Expirationskohlendensäure in Prozenten der applizierten Aktivität bei normal ernährten und EFA-Mangelratten

Fettsäure	Normal-Ratten				EFA-Mangelratten			
	Tier		CO ₂ nach		Tier		CO ₂ nach	
	No.	Gew. g	6 Std.	24 Std.	No.	Gew. g	6 Std.	24 Std.
γ -Linolensäure	9	111	28,4	43,2	13	95	32,4	58,8
	10	123	48,7	73,1	14	99	20,1	74,7
	11	118	28,3	50,3	15	86	39,7	63,5
	12	120	31,8	45,5	16	94	33,1	63,3
	31	133	40,7	60,6				
	32	107	38,4	67,4				
Linolsäure	3	128	26,0	60,6	17	112	19,7	42,0
	26	113	51,7	74,5	18	112	21,3	39,0
	27	141	22,2	31,4	19	102	12,0	36,1
	28	133	32,3	66,1	20	96	14,4	34,9
Ölsäure	1	112	10,6		4	158	14,9	43,7
	2	133	26,0		22	121	17,9	52,9
	6	76	23,5	41,5	23	116	14,3	46,2
	7	88	27,6	79,5	24	108	13,0	43,2
	8	75	24,9	74,1				
	21	110	27,2	64,5				
	25	126	22,1	56,9				
	29	141	14,3	23,6				
	30	138	14,9	34,9				

Abbau ^{14}C -signierter Fettsäuren durch EFA-Mangelratten. Aktivitäten der Expirationskohlendioxid in ‰ der applizierten Aktivität.

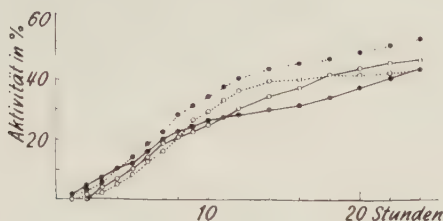


Fig. 1 *. Ölsäure. Tiere 4, 22, 23, 24

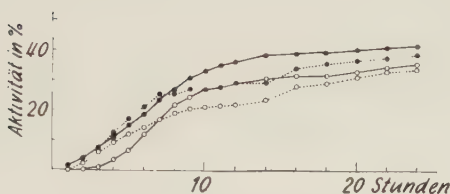


Fig. 2 *. Linolsäure. Tiere 17, 18, 19, 20

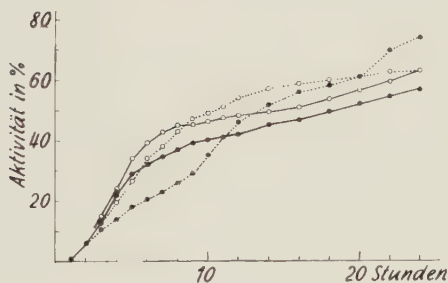


Fig. 3 *. γ -Linolensäure. Tiere 13, 14, 15, 16

Aus der graphischen Darstellung dieser Befunde (Fig. 1, 2 und 3) geht eine für einen biologischen Versuch bemerkenswerte Regelmäßigkeit und Übereinstimmung des beobachteten Fettsäureabbaues innerhalb einer Gruppe von 4 Tieren hervor. γ -Linolensäure wird im Verlaufe von 24 Stunden in signifikant größerem Ausmaß oxydiert

* Mit der freundlichen Genehmigung des Verlags der Helv. Chim. Acta.

als Ölsäure ($p = 0,01—0,001$), letztere wird in der gleichen Zeit in größerem Umfang abgebaut als die Linolsäure ($p = 0,05—0,01$).

Mead und Mitarbeiter (17) haben bei EFA-Mangelmäusen nach Gabe carboxylsignierter Linolsäure mehr Aktivität in der Expirationskohlensäure gefunden als nach Ölsäure. Unsere Befunde zeigen, daß die essentielle Linolsäure von EFA-Mangelratten bevorzugt retiniert wird.

Interessant ist die Feststellung, daß die γ -Linolensäure durch EFA-Mangelratten in größerem Ausmaß oxydiert wird als die Linolsäure. Beiden Verbindungen soll nämlich nach *Thomasson* (12) quantitativ gleiche biologische Aktivität zukommen. Eine mögliche Interpretation für den raschen und umfangreichen Abbau der γ -Linolensäure wird später erörtert.

Bei den *Normaltieren* finden wir in der ausgeatmeten Kohlensäure recht unterschiedliche Anteile der mit der γ -Linolensäure, Linolsäure oder Ölsäure zugeführten Aktivität (Tab. 2). Die gemessenen Werte betragen

nach Gabe von γ -Linolensäure	43,2—73,1 %
nach Gabe von Linolsäure	31,4—74,5 %
nach Gabe von Ölsäure	23,6—79,5 %

Gesicherte Unterschiede im Verhalten der einzelnen Säuren d. h. im Ausmaße ihres Abbaues liegen somit nicht vor und ließen sich vielleicht auch an einem größeren analogen Tiermaterial nicht feststellen.

Eine Deutung dieser Befunde verlangt die Berücksichtigung verschiedener Faktoren. Einmal wurden diese Ratten bis zu ihrer Heranziehung zu den Stoffwechselversuchen viel weniger einheitlich gefüttert als die EFA-Mangeltiere, denen monatelang dieselbe Diät angeboten wurde. Ferner befanden sie sich in aktivem Wachstum, während die EFA-Mangeltiere nur unbedeutend an Gewicht zunahmen. Bekanntlich ist auch der Grundumsatz bei wachsenden Tieren stärkeren Schwankungen unterworfen.

Reinius (18) verfolgte den Abbau einer Linolsäure geringer Aktivität, die biosynthetisch aus aktivem Zucker durch *Trichosporon pullulans* hergestellt wurde, an einer normalen und einer EFA-Mangelratte. Da der Versuch nur an je einem Tier und nur während 6 Stunden ausgeführt wurde, läßt er keine verbindlichen Aussagen zu.

Mead und Mitarbeiter (17) fanden nach Gaben carboxylsignierter Stearinsäure und Linolsäure bei normalen Mäusen in der Expirationskohlendensäure weniger Aktivität als bei EFA-Mangeltieren. Das Umgekehrte war der Fall nach Verabreichung von Ölsäure. Unsere eigenen Befunde an Normalratten (vgl. Tab. 2) schwanken zu stark, um einen Vergleich mit den an EFA-Mangelratten erhobenen Abbauwerten zuzulassen, während bei den letzteren hinsichtlich des Verhaltens zu den drei untersuchten Säuren gesicherte Unterschiede bestanden.

Wie bereits erwähnt, wurde zur Charakterisierung des zeitlichen Verlaufes der Fettsäureoxydation die Aktivität der Expirationskohlendensäure zuerst stündlich, dann alle zwei Stunden gemessen. Die erhaltenen Resultate für die Mangeltiere sind aus der Tabelle 3 ersichtlich und zudem in Figur 4 graphisch ausgewertet. Dabei haben wir die jeweiligen Mittelwerte von vier Tieren verwendet. Die höchsten Aktivitäten ausgedrückt in % der applizierten Aktivität finden wir bei der γ -Linolensäure nach der fünften Stunde, bei der Linolsäure nach der sechsten Stunde, bei der Ölsäure nach der achten Stunde. Selbst bei den Normaltieren lassen sich trotz der erheblichen Schwankungen ganz ähnliche Verhältnisse erkennen. Auch hier ist es wiederum die γ -Linolensäure, die am raschesten dieses Maximum erreicht.

*Abbau 14 C-signierter Fettsäuren durch EFA-Mangelratten.
Pro Stunde in der Expirationskohlendensäure aufgetretene Aktivität in %
der verabreichten Aktivität. Durchschnittswerte von je 4 Tieren.*

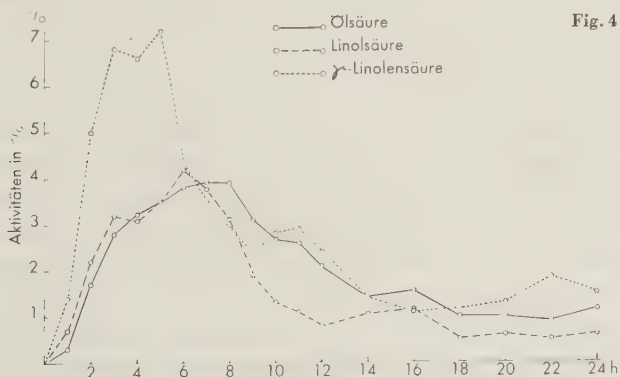


Tabelle 3.

Aktivität der Expirationskohlendensäure in ‰ der als γ -Linolen-, Linol- oder Ölsäure zugeführten Gesamtaktivität
Durchschnittswerte von je 4 EFA-Mangelratten

Std. nach Applikation	γ -Linolensäure ‰	Linolsäure ‰	Ölsäure ‰
1	1,4	0,7	0,3
2	5,0	2,2	1,7
3	6,8	3,2	2,8
4	6,6	3,1	3,2
5	7,2	3,5	3,5
6	4,3	4,2	3,8
7	3,5	3,8	3,9
8	2,9	3,2	3,9
9	2,4	1,9	3,1
10	2,8	1,3	2,7
11	2,9	1,1	2,6
12	2,4	0,8	2,1
14	2,8	2,1	2,8
16	2,2	2,3	3,2
18	2,3	1,0	2,0
20	2,6	1,3	2,0
22	3,7	1,0	1,8
24	3,0	1,3	2,3

Nachdem alle drei Verbindungen in analoger Weise in Olivenöl gelöst verabreicht wurden und das Gesamtfettangebot stets 0,5 ml betrug, sind die beobachteten Verschiedenheiten offenbar nicht durch unterschiedliche Resorptions-Geschwindigkeiten bedingt. Es scheint uns nicht ausgeschlossen, daß die γ -Linolensäure infolge ihrer physikalischen Eigenschaften — sie verhält sich bei der chromatographischen Trennung auf Papier wie Laurinsäure — nach dem Durchgang durch die Darmwand einen anderen Weg beschreitet. Sie könnte sehr wohl, jedenfalls teilweise nicht über den Lymphweg, sondern wie die Laurinsäure mit dem Pfortaderblut der Leber direkt zugeführt werden. Damit wäre die Möglichkeit ihres raschen Abbaues, wie er aus unseren Untersuchungen eindeutig hervorgeht, einer Erklärung zu-

gänglich. Linolsäure und Ölsäure, deren Abbau hinsichtlich des zeitlichen Verlaufes sehr ähnlich ist (vgl. Fig 4.) werden, wie *Blomstrand* (19) an Ratten mit ductus thoracicus-Fisteln nachweisen konnte, hauptsächlich über das Lymphsystem resorbiert.

Aus unseren Befunden ergeben sich folgende Schlußfolgerungen:

Per os zugeführte Linolsäure wird durch EFA-Mangelratten in kleinerem Umfang abgebaut als Ölsäure. Mit anderen Worten, der an essentiellen Fettsäuren verarmte Organismus dieser Tiere retiniert die lebensnotwendige Linolsäure stärker als die banale Ölsäure. Diese Beobachtung ist statistisch gesichert.

7-Linolensäure wird durch EFA-Mangeltiere schneller und in signifikant größerem Ausmaß oxydiert als Linolsäure und Ölsäure. Die Hypothese, daß diese Triensäure nicht wie die anderen C_{18} - und höheren Säuren durch die Lymphgefäße aus dem Darm abgeführt wird, sondern partiell mit dem Pfortaderblut direkt in die Leber gelangt, wird als mögliche Erklärung dieser Tatsache diskutiert.

II. Hydrierung und Dehydrierung von Fettsäuren im Tierkörper.

Bestimmungen der Jod-Zahl führten zur Erkenntnis, daß der Schmelzpunkt der Körperfette den Umweltbedingungen, d. h. der Außentemperatur angepaßt wird und der Sättigungsgrad bei am Äquator lebenden Tieren bedeutend höher ist als bei solchen, die sich in kalten Regionen aufhalten. Auch der Anteil der ungesättigten Säuren am menschlichen Körperfett ist stets beträchtlich. Zahlreiche Versuche wurden zum Nachweis und zur Charakterisierung von Fettsäurehydrasen unternommen — *Le Breton* (20), *Lang* (21), (22), (23), (24) und *Cremer* (25) —, wobei vor allem nach Enzymen gesucht wurde, die z. B. die Umwandlung der Stearin- in Ölsäure bzw. der Ölsäure in Stearinsäure bewerkstelligen.

Experimentelle Beweise stattfindender Dehydrierungen und Hydrierungen erbrachten die Arbeiten *Schönheimers* und *Rittenbergs* (15), (16). Nach Fütterung von Deuterio-Stearinsäure an Mäuse konnte D-haltige Ölsäure nachgewiesen werden und nach Verabreichung von signierter Ölsäure, D-haltige Stearinsäure. *Schönheimer* und *Stetten* (26) zeigten auch den Übergang der Palmitin- in die Palmitoleinsäure.

Das Verhalten der Doppelbindungen ungesättigter Fettsäuren bei ihrem Abbau ist völlig ungewiß. Die Möglichkeit einer vor der Oxydation eintretenden Hydrierung ist diskutierbar; was zum Abbau gelangt, wäre dann eine gesättigte Säure.

Wir haben in den folgend beschriebenen Versuchen die bereits erwähnten, über die C-Kette ^{14}C -signierten Polyenfettsäuren, also die Linol- und die γ -Linolensäure hoher Aktivität an Ratten verfüttert und diese nach einer bestimmten Zeit getötet. Aus dem Carcaß und der Leber wurden die Fettsäuren gewonnen, daraus haben wir chromatographisch Stearin-, Palmitin- und Ölsäure isoliert und ihre Aktivität geprüft. Auch das Cholesterin gelangte zur Untersuchung.

Es war angezeigt, zu Vergleichszwecken eine bereits bekannte Hydrierung und Dehydrierung, nämlich den reversiblen Übergang von Ölsäure zu Stearinsäure, in die Untersuchung miteinzubeziehen. Daher wurden auch signierte Ölsäure bzw. signierte Stearinsäure an Ratten verabreicht.

Experimentelles

Normale, männliche weiße Ratten erhielten signierte Stearin-, Öl-, Linol- oder γ -Linolensäure gelöst in Olivenöl durch eine Schlundsonde verabreicht. 8 bzw. 24 Stunden nach der Applikation wurden die Versuchstiere durch Dekapitation getötet. Aus der Leber und dem eviscerierten Tierkörper (— Carcaß) wurden die Gesamtfettsäuren und das Unverseifbare möglichst quantitativ gewonnen. Die Aktivität dieser Gesamtfettsäuren wurde gemessen. Ferner gewannen wir aus diesen Fettsäuregemischen papierchromatographisch Stearinsäure, Palmitinsäure und in zwei Fällen auch Ölsäure, um die Stoßzahl jeder einzelnen Säure zu bestimmen. Aus dem Unverseifbaren wurde das Cholesterin als Digitonid gefällt und auf Aktivität geprüft.

Tiermaterial und Applikation der signierten Fettsäuren wurden bereits beschrieben (siehe S. 10). Lebern und Carcaß unserer Versuchstiere verseiften wir mit methanolischer 30%iger Kalilauge am Rückfluß im Stickstoffstrom während zwei Stunden. Zur Gewinnung des Unverseifbaren wurde die alkalische Lösung mit Petroläther ausgeschüttelt. Nach Ansäuern mit Salzsäure erhielten wir die Fettsäuren

durch erneute Extraktion mit demselben Lösungsmittel. Die Petrolätherauszüge wurden mit Wasser gewaschen, getrocknet und unter Stickstoff eingedampft.

Die papierchromatographische Trennung wurde nach den Angaben von Wagner (27) mit einigen kleinen Modifikationen ausgeführt. Wir verwendeten das Papier «Schleicher & Schüll 2043 b gewaschen». Pro Bogen wurden bis 10 mg Fettsäuregemisch in 5%iger benzolischer Lösung als Streifen über die ganze Breite des Papiers aufgetragen. Längsschnitte zur Bahntrennung waren überflüssig. Jedes Chromatogramm wurde mit 1300—1500 mg Kohlenwasserstoff besprüht und unmittelbar darauf ins Chromatographiegefäß verbracht. Die Laufzeit betrug 48 Stunden. Zur Lokalisierung der getrennten Fettsäuren schnitten wir von den Längsrändern jedes Bogens ca. 5 mm breite Teststreifen ab und entwickelten sie mit der Kupferferrocyanid-Methode. Die so ermittelten Zonen wurden ausgeschnitten und daraus die isolierten Fettsäuren mit Heptan + 1% Eisessig eluiert.

Ölsäure und Palmitinsäure sind durch diese Chromatographie nicht trennbar. Wir oxydierten deshalb zur Eliminierung der Ölsäure die ungesättigten Fettsäuren des Gemisches vor der Trennung mit Kaliumpermanganat in alkalischer Lösung, um reine Palmitinsäure zu erhalten. Zur Gewinnung von Ölsäure chromatographierten wir das unvorbehandelte Gemisch und eluierten die Palmitin-/Ölsäurefraktion. Nach deren Hydrierung in Eisessig, mit Palladium auf Tierkohle als Katalysator, wurde rechromatographiert und die zur Stearinsäure hydrierte Ölsäure von der Palmitinsäure getrennt herausgelöst.

Um die Radioaktivität zu messen, wurden alle Proben nach der in unseren Laboratorien üblichen Methode feucht verascht und der ^{14}C -Gehalt der entstandenen Kohlensäure im Gaszählrohr bestimmt.

Die spezifischen Aktivitäten der von uns untersuchten Lipide sind in Tabelle 4 und 5 zusammengestellt.

Tabelle 4.

Spezifische Aktivitäten der Leber- und Carcaßfettsäuren nach Gabe von ^{14}C -signierter γ -Linolen-, Linol- oder Ölsäure

	Tier No.	Tier Gewicht g	verabreichte Gesamtkaktivität C/Min	Organ *	Gesamtfettsäure C/Min/mg	Stearinsäure C/Min/mg	Palmitinsäure C/Min/mg	Cholesterin C/Min/mg
8 Std. nach Gabe von Ölsäure	1	260	$61,4 \cdot 10^6$	L	5725	437	472	1400
	2	270	$61,4 \cdot 10^6$	L	5550	325	485	1140
	1	260	$61,4 \cdot 10^6$	C	515	160	84	420
	2	270	$61,4 \cdot 10^6$	C	377	125	82	160
24 Std. nach Gabe von Linolsäure	3	141	$9,17 \cdot 10^6$	L	1495	315	235	196
	4	133	$9,17 \cdot 10^6$	L	2180	440	340	212
24 Std. nach Gabe von γ -Linolensäure	5)	107)	$40,4 \cdot 10^6$	L)	17000	1150	1340	2200
	6)	133)		L)				
	7)	111)		L)				
	8)	118)	$18,1 \cdot 10^6$	L)	6830	340	360	720
	9)	120)		L)				
	5	107	$40,4 \cdot 10^6$	C	945	225	100	720

* L = Leber, C = Carcaß

Tabelle 5.

Spezifische Aktivitäten der Stearin-, Palmitin- und Ölsäure sowie des Cholestrins in der Leber, 8 Stunden nach Verabreichung von ^{14}C -Stearinsäure

Tier No.	Tiergewicht g	verabreichte Gesamtkaktivität C/Min	Gesamtfettsäure mg	Stearinsäure C/Min/mg	Palmitinsäure C/Min/mg	Ölsäure C/Min/mg	Cholesterin C/Min/mg
10	181	$10 \cdot 10^6$	259	7600	1600	1170	150
11	193	$8,4 \cdot 10^6$	187	8700	2150	1400	230

Um das Auftreten des ^{14}C -Isotops in der Stearin-, Palmitin- und evtl. Ölsäure nach Gabe einer bestimmten signierten Fettsäure mengenmäßig abzuschätzen, wurde die totale Aktivität der gesamten Stearin-, Palmitin resp. Ölsäure von Leber und Carcaß unserer Ratten errechnet. Dies sei an Hand eines Beispiels erläutert:

Bekannt sind aus unseren Messungen die spezifischen Aktivitäten der Gesamtfettsäuren, der Stearinsäure, der Palmitinsäure, evtl. der Ölsäure und das Gewicht der Gesamtfettsäuren. Für die Leber von Tier Nr. 1 lauten diese Werte:

Gewicht der Gesamtfettsäuren	366 mg
spez. Aktivität der Gesamtfettsäuren	5725 C/Min pro mg
spez. Aktivität der Stearinsäure	437 C/Min pro mg
spez. Aktivität der Palmitinsäure	472 C/Min pro mg

Durchschnittswerte der prozentualen Fettsäurezusammensetzung für Leber und Carcaß wurden kürzlich von *Wagner* (28) an Ratten erhoben, welche unseren Versuchstieren entsprachen:

	Stearinsäure	Palmitinsäure	Ölsäure	Polyensäuren
Leber	16 %	19 %	49 %	16 %
Carcaß	8,8 %	27 %	58 %	6,2 %

Die gesuchte Fettsäurezusammensetzung ist demnach etwa folgende:

Gesamtfettsäuren	366 mg	100 %
Stearinsäure	58,5 mg	16 %
Palmitinsäure	69,5 mg	19 %
Öl- und Polyensäuren	238 mg	65 %

Das Produkt aus spezifischer Aktivität mal Gewicht der verschiedenen Fettsäuren entspricht der Gesamtaktivität:

Gesamtfettsäuren	5725 C/Min/mg mal 366 mg	= $2,1 \cdot 10^6$ C/Min
Stearinsäure	437 C/Min/mg mal 58,5 mg	= 25 600 C/Min
Palmitinsäure	472 C/Min/mg mal 69,5 mg	= 32 800 C/Min

Nach Gabe ungesättigter signierter Fettsäuren interessierten wir uns für die Aktivität der totalen Stearinsäure und Palmitinsäure. Die Gesamtaktivität der totalen Stearin- und Palmitinsäurefraktion wird in Tabelle 6 in Prozenten der Totalstoßzahl der Gesamtfettsäuren desselben Organs angegeben.

Tabelle 6.

Aktivitäten der Stearinsäure und der Palmitinsäure in ‰ der Gesamtaktivität der entsprechenden Organfettsäuren ausgedrückt. 8 bzw. 24 Std. nach Gabe von ^{14}C γ -Linolen-, Linol- oder Oelsäure.

	Tier No.	Untersuchtes Organ	Gesamtfettsäure ‰ ^{14}C	Stearinsäure ‰ ^{14}C	Palmitinsäure ‰ ^{14}C	ungesättigte Fettsäure ‰ ^{14}C
8 Std. nach Gabe von Ölsäure	1	Leber	100	1,2	1,5	97,3
	2	Leber	100	0,94	1,6	97,46
	1	Carcaß	100	2,7	4,4	92,9
	2	Carcaß	100	2,7	5,9	91,2
24 Std. nach Gabe von Linolsäure	3	Leber	100	3,4	3	93,6
	4	Leber	100	3,2	3	93,8
24 Std. nach Gabe von γ -Linolensäure	5/6	Leber	100	1,1	1,5	97,4
	7/8/9	Leber	100	0,8	1	98,2
	5	Carcaß	100	2,1	2,9	95

In unserem Beispiel fanden wir folgende Verteilung der Radioaktivität auf die Leberfettsäuren:

Gesamtfettsäuren	$2,1 \cdot 10^6$	C/Min = 100 ‰
Stearinsäure	25 600	C/Min = 1,2 ‰
Palmitinsäure	32 800	C/Min = 1,5 ‰
Öl- und Polyensäuren		97,3 ‰

Bei zwei Ratten wurde nach Verabreichung von ^{14}C markierter Stearinsäure die Gesamtaktivität der Stearin-Palmitin- und der Ölsäure in der Leber bestimmt. Um die Verteilung des ^{14}C -Istops auf diese drei Fettsäuren in der Leber zu zeigen, wurde in Tabelle 7 die Gesamtstoßzahl der Stearin-, Palmitin- und Ölsäurefraktion in Prozenten der Summe der Gesamtaktivitäten der drei eben genannten Fettsäuren angegeben.

Tabelle 7.

Prozentuale Verteilung der Aktivität auf Stearin-, Palmitin- und Ölsäure der Leber, 8 Stunden nach Verabreichung von ^{14}C -Stearinsäure

Tier No.	Stearin-, Palmitin- und Ölsäure ‰	Stearinsäure ‰	Palmitinsäure ‰	Ölsäure ‰
10	100	58	14,5	27,5
11	100	56	16,5	27,5

Diskussion der Ergebnisse

Einleitend sei darauf hingewiesen, auf welchen Wegen das ^{14}C -Isotop aus den zugeführten signierten Fettsäuren in die von uns untersuchten Lipide gelangen kann:

1. Direkter Übergang der signierten Fettsäure in eine andere Fettsäure, durch Kettenverlängerung oder -verkürzung, Hydrierung oder Dehydrierung.
2. β -Oxydation der markierten Fettsäure und Synthese von Fettsäuren und anderen Stoffen wie z. B. Cholesterin aus ^{14}C -Acetyl-Coenzym A.

Auf dem zweiten indirekten Wege wird in Stearinsäure, Palmitinsäure, Ölsäure, Cholesterin etc. das ^{14}C -Atom über den sogenannten Acetatpool eingebaut. Wird hingegen eine Fettsäure durch direkten Übergang aus einer gegebenen signierten Fettsäure gebildet, so muß ihr ^{14}C -Gehalt viel größer sein als jener der über den Acetatpool signierten Lipide.

1. Hydrierung ungesättigter Fettsäuren im Tierkörper.

Unsere Versuche zur Abklärung einer allfälligen Hydrierung der lebensnotwendigen Linol- und γ -Linolensäure sowie der nicht essentiellen Ölsäure werden hier gemeinsam besprochen.

Nach Verabreichung ungesättigter ^{14}C -markierter Säuren weisen die gesättigten Fettsäuren und das Cholesterin aus Leber und Carcass

spezifische Aktivitäten gleicher Größenordnung auf (vergl. Tab. 4). Wie aus Tabelle 6 hervorgeht, finden wir nach Verabreichung ^{14}C -signierter γ -Linolen-, Linol- und Ölsäure in den gesättigten Fettsäuren nur einen unbedeutenden Anteil der applizierten Aktivität. Die Stearinsäure der Leber enthält maximal 3,5 ‰, die Palmitinsäure höchstens 3 ‰ der Aktivität der Gesamtfettsäuren. Vom totalen ^{14}C -Gehalt der Carcaßfettsäuren entfielen stets weniger als 3 ‰ auf die Stearinsäure und weniger als 6 ‰ auf die Palmitinsäure.

Hervorzuheben ist, daß die Palmitinsäure gleich, oder stärker aktiv ist als die Stearinsäure. Palmitinsäure entsteht aber nicht direkt aus ungesättigten C-18-Säuren, sondern wird über den Acetatpool signiert.

Die biologische Halbwertszeit der Stearin- und der Palmitinsäure im Tierkörper ist nach Angaben von *Bernhard* (29), *Anker* (30) und *Tove* (31) etwa gleich groß, mit anderen Worten, beide Fettsäuren werden im Organismus mit ungefähr gleicher Geschwindigkeit regeneriert. Deshalb ist in unseren Versuchen der Einbau von ^{14}C aus dem Acetatpool in Stearinsäure und in Palmitinsäure in ähnlichem Umfang zu erwarten. Da wir in der Stearinsäure nicht wesentlich mehr Aktivität fanden als in der Palmitinsäure, kommen wir zur Überzeugung, daß der Übergang, des ^{14}C -Isotops aus der verabreichten γ -Linolen-, Linol- oder Ölsäure in die Stearinsäure lediglich über das β -oxydativ entstandene C-Zweierbruchstück geht und keinen Anhaltspunkt für eine Hydrierung dieser ungesättigten Fettsäuren im Organismus der Ratte liefert.

Die Beobachtung, daß die spezifischen Aktivitäten der Stearin-, Palmitinsäure und des Cholesterins (vgl. Tab. 4) von gleicher Größenordnung sind, zeigt ebenfalls, daß alle drei Verbindungen auf dem gleichen Weg, über den Acetatpool, signiert wurden. Fassen wir unsere Versuchsergebnisse zusammen, kommen wir zu folgender Schlußfolgerung:

Nach Verabreichung von ^{14}C -signierter γ -Linolensäure, Linolsäure oder Ölsäure gelangt ein kleiner Teil der Aktivität durch Synthese aus dem β -oxydativ entstandenen Acetyl-Coenzym A in die Stearinsäure, Palmitinsäure, und ins Cholesterin der Gewebe unserer Versuchstiere. Eine Hydrierung von γ -Linolen-, Linol- oder Ölsäure im Organismus der Ratte kann nicht nachgewiesen werden.

2. Dehydrierung einer gesättigten Fettsäure im Tierkörper.

Acht Stunden nach Applikation von ^{14}C -signierter Stearinsäure ist die spezifische Aktivität der Leber-Ölsäure sechs mal größer als diejenige des Cholesterins desselben Organs. Die Stoßzahl pro mg Palmitinsäure übersteigt jene pro mg Cholesterin sogar um eine ganze Zehnerpotenz (vgl. Tab. 6.)

Die prozentuale Verteilung des ^{14}C -Isotops auf Stearin-, Palmitin- und Ölsäure der untersuchten Lebern ergibt sich aus Tab. 7. Auf die Ölsäure fallen 27,5 %, auf die Palmitinsäure ca. 15 % der Gesamtaktivität der drei geprüften Fettsäuren. Alle diese Befunde stimmen bei beiden Versuchen weitgehend überein. Der sehr ausgeprägte Übergang der Aktivität aus Stearinsäure in Ölsäure und Palmitinsäure, sowie die großen spezifischen Aktivitäten der beiden letztgenannten Säuren verglichen mit denjenigen des Cholesterins beweisen die Entstehung beider Säuren aus Stearinsäure. Sowohl die Dehydrierung von Stearinsäure zu Ölsäure als auch ihr Übergang in Palmitinsäure durch Abspaltung der beiden ersten C-Atome sind qualitativ schon mehrfach bestätigte Vorgänge (15), (16), (32). Unsere eigenen Beobachtungen geben einen Einblick in die Größenordnung dieser Umwandlungen. Wir kommen somit zu folgender Beantwortung der eingangs gegebenen Fragestellung.

1. Eine Hydrierung der essentiellen Linolsäure und γ -Linolensäure im Organismus der Ratte läßt sich nicht nachweisen. Da bekanntlich eine Dehydrierung gesättigter Fettsäuren zu diesen Polyensäuren im Tierkörper auch nicht stattfindet, haben wir keinen Grund mehr zur Annahme, daß die Linolsäure oder die γ -Linolensäure in die gesättigte C-18-Säure übergehen können. Demnach geht auch dem Abbau dieser Polyensäuren nicht eine Hydrierung voraus.
2. Die Dehydrierung von Stearinsäure zu Ölsäure ist, nach unseren Befunden, ein Vorgang, der zumindest in der Leber, auch mengenmäßig von Bedeutung ist. Die Hydrierung der Ölsäure ist anderseits *nicht* nachweisbar. Wenn der Übergang von Stearinsäure zu Ölsäure überhaupt ein reversibler Vorgang ist, dann liegt dessen Gleichgewicht stark auf der Seite der Dehydrierung.

Zusammenfassung

1. An Ratten wird Ausmaß und zeitlicher Verlauf des Abbaues der essentiellen γ -Linolen- bzw. Linolsäure und der Ölsäure untersucht. Zu diesem Zweck wird nach Verabreichung der entsprechenden ^{14}C -signierten Fettsäuren das Auftreten von Aktivität in der Expirationskohlendensäure verfolgt.

Ratten, welche mit einer an essentiellen Fettsäuren freien Diät ernährt wurden, oxydieren im Verlaufe von 24 Stunden Linolsäure in kleinerem Umfang als Ölsäure, sie retinieren die essentielle Linolsäure stärker als die Ölsäure.

Die ebenfalls essentielle γ -Linolensäure wird von diesen Tieren rascher und in größerem Ausmaß abgebaut als Linolsäure und die nicht essentielle Ölsäure. Als Erklärung dieser Beobachtung wird eine vermehrte Resorption der γ -Linolensäure über das Pfortadersystem diskutiert. Bei normalen Ratten finden wir für keine der drei untersuchten Fettsäuren einheitliche Abbauraten.

2. Es wird auf die Bedeutung und auf die bestehenden experimentellen Beweise der Dehydrierung und Hydrierung von Fettsäuren im Tierkörper hingewiesen und versucht, diese Reaktionen nachzuweisen.

In unseren Versuchen erhalten Ratten die ungesättigte ^{14}C -signierte Ölsäure, Linol- bzw. γ -Linolensäure hoher Aktivität. Aus Leber und Carcaß wird die gesättigte Stearinsäure gleicher Kettenlänge, sowie Palmitinsäure, papierchromatographisch isoliert und Cholesterin als Digitonid gewonnen. In allen drei Lipiden wird eine geringe Aktivität gleicher Größenordnung gefunden, welche als Folge der Synthese der drei Verbindungen aus dem Acetatpool aufgefaßt wird. Die Stearinsäure weist somit keine Aktivität auf, die durch direkte Hydrierung der hochaktiven ungesättigten C-18-Säuren bedingt ist. Die Hydrierung von γ -Linolensäure und Linolsäure, sowie auch von Ölsäure findet nicht oder in nicht nennenswertem Umfang statt.

Nach Verabreichung von ^{14}C -markierter Stearinsäure beobachteten wir in der aus den Leberfettsäuren papierchromatographisch isolierten Ölsäure eine hohe Stoßzahl. Sie beträgt über ein Viertel der Aktivität der Gesamtfettsäuren der Leber und ist

6—7mal so groß als die Aktivität des Cholesterins. Dieser Befund gibt uns nicht nur eine qualitative Bestätigung, sondern auch einen Hinweis auf die quantitative Bedeutung der Dehydrierung von Stearinsäure zu Ölsäure.

Literaturverzeichnis

1. K. Bernhard, Zschr. f. Vitamin-, Hormon- und Fermentforsch. I, 199—215, (1947).
2. F. Bullet, Med. Diss. Univ. Zürich (1943).
3. H. J. Deuel, Progress in the Chem. of fats and other Lipids. Vol. 2 (1954).
4. R. T. Holman, "The Vitamins". Vol. 2 Academic Press New York (1954).
5. G. Steinberg, W. H. Slaton, D. R. Howton, J. F. Mead, J. Biol. Chem. 220, 257 (1956).
6. E. Klenk, Z. physiol. Ch. 302, 268 (1955).
7. K. Bernhard, H. Steinhauser, F. Bullet, Helv. Chim. Acta 25, 1313 (1942).
8. K. Bernhard, R. Schönheimer, J. Biol. Chem. 133, 707 (1940).
9. J. F. Mead, A. Steinberg, D. R. Howton, J. Biol. Chem. 205, 683 (1953).
10. A. T. James, J. E. Lovelock, J. Webb, Biochem. J. 66, 60 P (1957).
11. G. O. Burr, M. M. Burr, J. Biol. Chem. 82, 345 (1929).
12. H. J. Thomasson, Internat. Z. f. Vitaminforsch. 25, 62 (1953).
13. K. Bernhard, M. Rothlin, J.-P. Vuilleumier, R. Wyß, Helv. Chim. Acta 41, 1017 (1958).
14. K. Bernhard, U. Gloor, Helv. Chim. Acta 35, 1908 (1952).
15. R. Schönheimer, D. Rittenberg, J. Biol. Chem. 113, 505 (1936).
16. R. Schönheimer, D. Rittenberg, J. Biol. Chem. 117, 485 (1937).
17. J. F. Mead, W. H. Slaton, A. B. Decker, J. Biol. Chem. 218, 401 (1956).
18. L. Reinius, Ann. Acad. Fennicae A II Chemica 49, 37 (1953).
19. R. Blomstrand, Acta physiol. Scand. 32, 99 (1954).
20. J. Champougny, E. le Breton, C. r. Soc. Biol. 139, 919 (1945).
21. K. Lang, Z. physiol. Ch. 261, 240 (1939).
22. K. Lang, H. Mayer, Z. physiol. Ch. 261, 249 (1939).
23. K. Lang, H. Mayer, Z. physiol. Ch. 262, 120 (1939).
24. K. Lang, F. Adickes, Z. physiol. Ch. 262, 123 (1939).
25. H. D. Cremer, Z. physiol. Ch. 263, 240 (1940).
26. D. Stetten, R. Schönheimer, J. Biol. Chem. 133, 329 (1940).
27. H. Wagner, L. Abisch, K. Bernhard, Helv. Chim. Acta 38, 1536 (1955).
28. H. Wagner, E. Seelig, K. Bernhard, Schw. Med. Wschr. 47, 1423 (1957).
29. K. Bernhard, R. Schönheimer, J. Biol. Chem. 133, 713 (1940).
30. A. Pihl, K. Bloch, H. S. Anker, J. Biol. Chem. 183, 441 (1950).
31. S. B. Tove, J. S. Andrews, H. L. Lucas, J. Biol. Chem. 218, 275 (1956).
32. R. Schönheimer, D. Rittenberg, J. Biol. Chem. 120, 155 (1937).

